

530, f23

Rec'd PCT/PTO 08 APR 2005

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
22 avril 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/032912 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/17, A61P 17/00, 35/00(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002907

(22) Date de dépôt international : 3 octobre 2003 (03.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/12697 11 octobre 2002 (11.10.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LMD
[FR/FR]; Rue du Pra de Serre, F-63960 Veyre Monton
(FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : JEAN, Daniel
[FR/FR]; 283, rue de la Chaussade, F-63270 Vic-Le-Comte
(FR).(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, 75847 Paris Cedex 17
(FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çuesEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.(54) Title: MEDICINE COMPRISING A THIOUREA FOR USE AS DEPIGMENTING AGENT OR ANTI-MUTAGENIC AND
ANTI-CARCINOGENIC AGENT(54) Titre : MÉDICAMENT COMPRENANT UNE THIOURÉE POUR SON UTILISATION EN TANT QUE DEPIGMENTANT
OU AGENT ANTIMUTAGÈNE ET ANTICARCINOGENE(57) Abstract: The invention concerns a medicine or a cosmetic composition comprising at least one thiourea of general formula (I),
or at least one of its monooxide or dioxide derivatives of general formulae (IIa), (IIb) and (III), or mixtures thereof. This medicine is
advantageously used for inhibiting tyrosinase, inhibiting melanin synthesis, for lightening or depigmenting the skin or for eliminating
age spots and as antimutagenic and anti-carcinogenic agent.(57) Abrégé : La présente invention concerne un médicament ou une composition cosmétique comprenant au moins une thiourée de
formule générale I suivante : I, ou au moins un de ses dérivés mono ou dioxydés de formules générales IIa, IIb et III suivantes : ou
leurs mélanges. Avantageusement ce médicament est utilisé pour inhiber la tyrosinase, inhiber la synthèse de la mélanine, éclaircir
ou dépigmenter l'épiderme ou éliminer les taches de vieillesse et en tant qu'agent antimutagène et anticarcinogène.

WO 2004/032912 A1

TITRE : MEDICAMENT COMPRENANT UNE THIOUREE POUR SON
UTILISATION EN TANT QUE DEPIGMENTANT OU AGENT
ANTIMUTAGENE ET ANTICARCINOGENE

5

La présente invention concerne des médicaments contenant des thiourées ou leurs dérivés mono ou dioxydés, en particulier ayant une action dépigmentante, mais également en tant qu'agent antimutagène et/ou anticarcinogène.

10 La pigmentation de la peau chez les humains provient d'une série complexe de processus cellulaires qui s'effectue dans une unique population de cellules appelées mélanocytes. Les mélanocytes sont situés dans la partie inférieure de l'épiderme, et leur fonction est de synthétiser un pigment brun, la mélanine, qui protège le corps des effets dommageables des radiations ultra violettes. La mélanine est déposée dans les mélanosomes, vésicules présentes à
15 l'intérieur des mélanocytes. Les mélanosomes sont expulsés des mélanocytes et véhiculés vers la surface de la peau par les kératinocytes, qui assimilent la mélanine contenue dans les mélanosomes. La teinte foncée de la peau est proportionnelle à la quantité de mélanine synthétisée par les mélanocytes et transférée aux kératinocytes. Dans certains cas, il est préférable de réduire ou
20 d'inhiber la mélanogénèse, par exemple, pour éclaircir la peau, pour éliminer les taches de vieillesse ou pour réduire l'hyperactivité des mélanocytes.

Pendant longtemps, les compositions cosmétiques contenant un peroxyde tel que le peroxyde d'hydrogène ou le peroxyde de zinc ont été utilisées dans le but d'enlever les taches, telles que les taches de rousseur, qui apparaissent sur la
25 peau. Toutefois, les peroxydes sont extrêmement instables et, en conséquence, leur stockage est problématique. De plus, l'incorporation stable de ces peroxydes dans des bases cosmétiques est difficile et les peroxydes eux-mêmes n'ont pas un effet suffisamment blanchissant.

D'un autre côté, des préparations cosmétiques comprenant de la vitamine
30 C, de la cystéine ou du soufre colloïdal ont commencé à être utilisées dans le but de blanchir la peau. Toutefois, les effets de ces substances ne sont pas satisfaisants.

Pendant longtemps, l'hydroquinone a été la molécule dépigmentante de référence et employée dans de nombreuses préparations de dermo-cosmétique. Toutefois, ce produit n'est pas sans danger et présente une cytotoxicité importante pour les mélanocytes susceptibles de provoquer des dépigmentations irréversibles.

5 Récemment, l'acide kojique a été utilisé efficacement en tant que substance inhibant la formation de la mélanine dans la peau humaine. En conséquence, différentes préparations cosmétiques destinées à dépigmenter la peau et contenant de l'acide kojique (publication de brevet japonais n°56-18569) ou un ester de l'acide kojique avec un acide carboxylique aromatique telle que
10 l'acide cinnamique ou l'acide benzoïque (publication de brevet japonais N° 60/100005) ou des diester de l'acide kojique (publications des brevets japonais N°61-60801 et 60-17961) ont été décrites. Ces acides kojiques et esters d'acide kojique sont donc connus comme étant des substances capables d'inhiber la mélanogénèse. Toutefois, l'acide kojique présente une efficacité variable selon les
15 individus et en moyenne insuffisante.

Les isothiocyanates et thiocyanates ont également été décrits comme dépigmentant (WO 02/058664).

En conséquence, la recherche d'autres produits dépigmentants est toujours d'actualité.

20

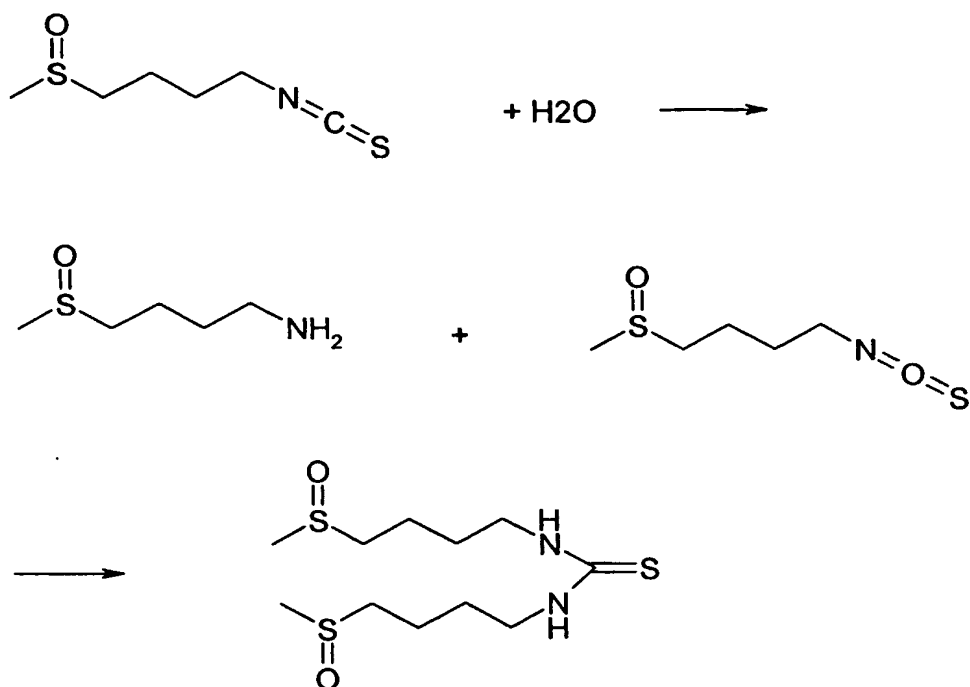
Jusqu'à présent, seules les phénylthiourées ont été décrites comme possédant une activité dépigmentante (demande de brevet n° US 2002/0044914). Certaines autres thiourées comme la thiourée, la phénylthiourée et la diméthylthiourée sont connues pour être sensibilisantes (Contact and photocontact
25 sensitivity problems associated with thiourea and its derivatives : A review of the literature and case reports. A. Dooms-Goosens et al., British Journal of Dermatology, 116, 4, 573-579).

Par ailleurs, certaines d'entre elles comme le carbimazole, sont utilisées comme anti-tyroïdes.

30

De façon surprenante, les déposants ont découvert que certaines molécules appartenant à la famille des thiourée avaient un effet inhibiteur très net de la synthèse de la mélanine in vitro.

5 Certes, la 1,3-bis-(5-méthanesulfinylbutyl) thiourée est connue comme étant un des produits de dégradation du sulforaphane (isothiocyanate ayant une activité dépigmentante : WO 02/058664) lors d'un contact prolongé avec l'eau, et en particulier avec de l'eau chaude par le procédé suivant :



(Thermal degradation of sulforaphane in aqueous solution, Yi Jin, Mingfu Wang, Robert T. Rosen, and Chi-Tang-Ho. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 3121-3123).

10 Toutefois, son activité pharmaceutique ou cosmétique, en particulier en tant que dépigmentant n'a jamais été décrit ou suggéré dans les documents de l'art antérieur, et il n'était pas évident qu'un produit de dégradation d'un produit dépigmentant ait une activité supérieure audit produit dépigmentant.

15

La mutagénèse se produit dans l'ADN et dans le développement des cellules spontanément ou naturellement, ou en tant qu'effet secondaire dû à des produits chimiques, à des radiations de haute énergie, au stress, etc...

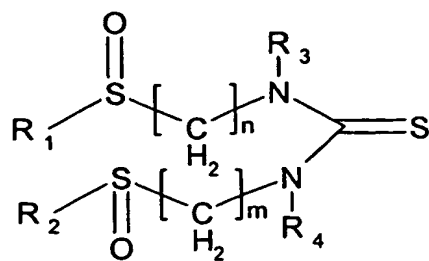
Les mutagènes sont des agents qui causent de telles mutations. Ils sont aussi également souvent carcinogènes (c'est-à-dire capable d'induire le cancer). La société actuelle est maintenant au courant et concernée par la présence de mutagènes dans son environnement. Les mutagènes sont omniprésents ; certains
5 sont naturellement présents dans les plantes, beaucoup d'autres sont produits par la combustion de matériaux organiques (en particulier durant la cuisson), et d'autres sont produits par l'industrie. De nos jours, la population se retrouve confrontée à beaucoup de problèmes de santé. Beaucoup de ces problèmes de santé sont le résultat des lésions des cellules et de l'ADN du corps humain causés
10 par les mutagènes et mais aussi par des facteurs de mutagénèse, facteurs qui contribuent à augmenter les lésions des cellules et de l'ADN. Ces mutagènes et facteurs de mutagénèse incluent entre autres la pollution, le stress, le vieillissement, la fumée de cigarette, la lumière ultraviolette, l'exercice excessif, les lésions des tissus, etc.... Parmi les maladies résultant des lésions des cellules
15 et de l'ADN, on peut citer : le vieillissement, les taches de vieillesse, les cancers, la cataracte, la peau sèche, la fatigue, les cancers de la peau, les dommages causés par le stress et les rides.

Bien que des compositions pharmaceutiques existent pour induire une activité antimutagène à l'intérieur du corps, elles possèdent parfois des effets
20 secondaires significatifs.

En conséquence, un besoin existe de trouver un nouveau produit ayant un effet antimutagène pour prévenir la mutagénèse à l'intérieur du corps et un effet anticarcinogène.

De façon surprenante, les déposants ont découvert que certaines molécules
25 appartenant à la famille des thiourées avaient un effet antimutagène et anticarcinogène très net aussi bien vis-à-vis des substances mutagènes que vis-à-vis des UVB.

La présente invention concerne donc un médicament comprenant au moins une
30 thiourée de formule générale I suivante :



I

dans laquelle :

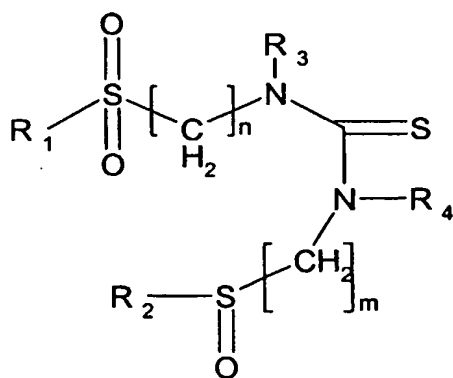
n est un nombre entier compris entre 1 et 12,

5 m est un nombre entier compris entre 1 et 12,

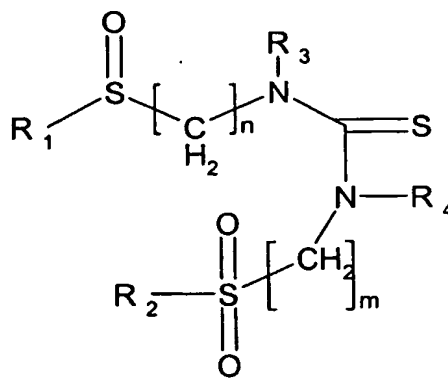
R₁, R₂, R₃ et R₄ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C₁-C₆ ou un groupe aryle,

ou au moins un de ses dérivés mono ou dioxydés de formules générales IIa, IIb et III suivantes :

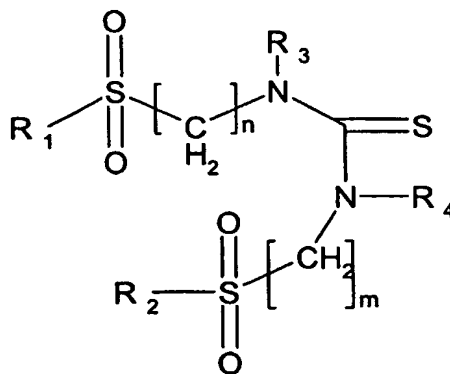
10



IIa



IIb



III

dans lesquels les R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , m et n sont tels que définis ci-dessus.
ou leurs mélanges.

Par le terme « groupe alkyle en C_1 - C_6 », on entend au sens de la présente
5 invention tout groupe alkyle de 1 à 6 atomes de carbones, linéaire ou ramifié, en
particulier, le groupe CH_3 .

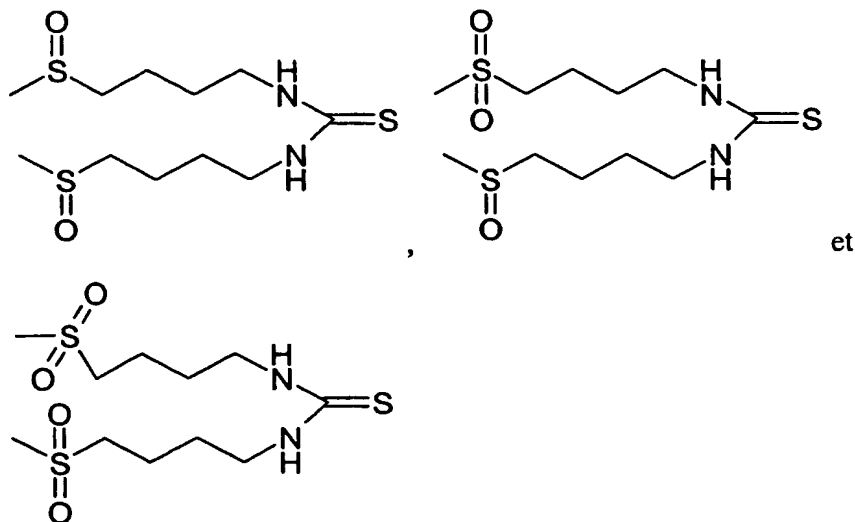
Par le terme « groupe aryle », on entend au sens de la présente invention
un ou plusieurs cycles aromatiques ayant 5 à 8 atomes de carbones, pouvant être
accolés ou fusionnés. En particulier, les groupes aryles peuvent être des groupes
10 phényle ou naphthyle et peuvent être substitués par des atomes d'halogène, des
groupes alkyle tels que définis ci-dessus, le groupe OH ou le groupe nitro.

Avantageusement les thiourées de formules générales I, IIa, IIb et III, sont
telles que les groupes R_1 et R_2 sont identiques, R_3 et R_4 sont identiques et $m = n$.
15 De façon encore plus avantageuse, $R_1 = R_2 = CH_3$.

Avantageusement $m = n = 4$.

De façon avantageuse $R_3 = R_4 = H$.

De façon encore plus avantageuse, il s'agit de la 1,3-bis-(5-méthanesulfinylbutyl)
thiourée, de la 1-(5-méthanesulfinylbutyl)-3-(5-méthanesulfonylbutyl) thiourée,
20 ou de la 1,3-bis-(5-méthanesulfonylbutyl) thiourée de formules suivantes :



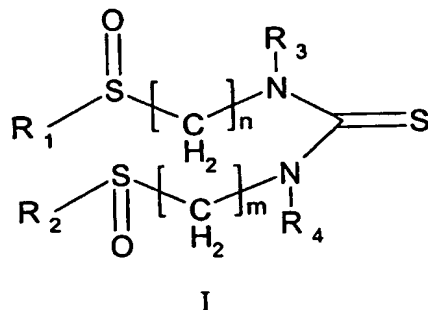
Les thiourées selon la présente invention sont soit disponibles commercialement, soit peuvent être préparés, par exemple pour la 1,3-bis(5-méthanesulfinylbutyl)-thiourée, par dégradation thermique du sulforaphane. En particulier les dérivés mono ou dioxydés peuvent être obtenus à partir de la thiourée non oxydée correspondante par action d'un agent oxydant tel que par exemple le peroxyde d'hydrogène.

De façon avantageuse, le médicament selon la présente invention est utile pour inhiber la tyrosinase, en particulier réduire de 50 % l'action de la tyrosinase, inhiber la synthèse de la mélanine, réduire l'hyperactivité des mélanocytes.

De façon avantageuse, le médicament selon la présente invention est utile en tant qu'agent antimutagène, en particulier, vis-à-vis des substances mutagènes et/ou vis-à-vis des UVB, et/ou en tant qu'agent anticarcinogène.

Avantageusement, ce médicament peut prévenir l'apparition de cancers, en particulier de cancers de la peau, des taches de vieillesse, du vieillissement, notamment celui de la peau, et des rides.

La présente invention concerne également des compositions cosmétiques comprenant au moins une thiourée, selon la présente invention, de formule générale I suivante :



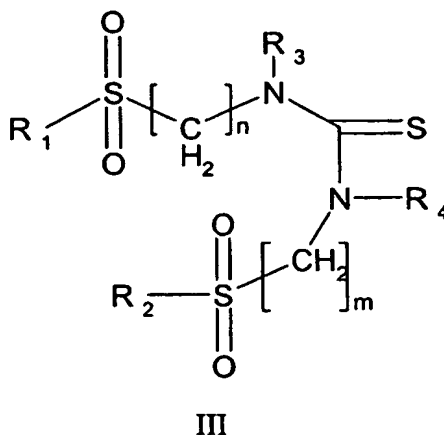
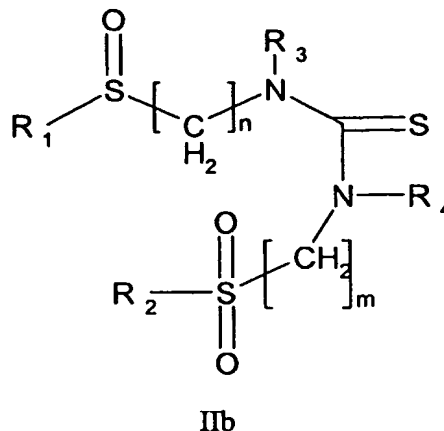
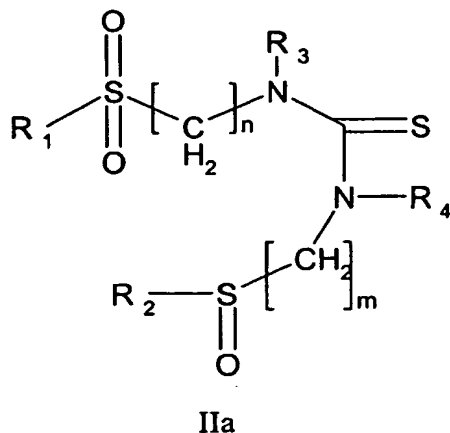
dans laquelle :

n est un nombre entier compris entre 1 et 12,

m est un nombre entier compris entre 1 et 12,

R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C_1 - C_6 ou un groupe aryle, ou au moins un de ses dérivés mono ou dioxydés de formules générales IIa, IIb et III suivantes :

5



- 10 dans lesquels les R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , m et n sont tels que définis ci-dessus.
ou leurs mélanges.

Avantageusement cette composition cosmétique est une composition dépigmentante. Elle peut être utilisée pour éclaircir, blanchir ou dépigmenter l'épiderme, éliminer les taches de la peau, en particulier de vieillesse ou de rousseur, ou prévenir la pigmentation de l'épiderme. De façon avantageuse, cette composition est destinée à une administration par voie topique.

15

De façon avantageuse, le médicament ou la composition cosmétique selon la présente invention se trouve sous une forme à usage orale ou topique, avantageusement à usage topique.

Il ou elle pourra se présenter sous les formes qui sont habituellement connues pour ce type d'administration, c'est à dire notamment les lotions, les mousses, les gels, les dispersions, les sprays, les sérums, les masques, les laits corporels ou les crèmes par exemple, avec des excipients permettant notamment une pénétration cutanée afin d'améliorer les propriétés et l'accessibilité du principe actif. Ces compositions contiennent généralement, outre le médicament ou l'actif cosmétique selon la présente invention, un milieu physiologiquement acceptable, en général à base d'eau ou de solvant, par exemple des alcools, des éthers ou des glycols. Elles peuvent également contenir des agents tensioactifs, des conservateurs, des agents stabilisants, des émulsifiants, des épaississants, d'autres principes actifs conduisant à un effet complémentaire ou éventuellement synergique, des oligo-éléments, des huiles essentielles, des parfums, des colorants, du collagène, des filtres chimiques ou minéraux, des agents hydratants ou des eaux thermales.

La présente invention concerne également un traitement cosmétique de la peau par application sur la peau d'une composition cosmétique selon la présente invention.

Les exemples suivant sont donnés à titre indicatif non limitatif.

Exemple 1 : Synthèse de la 1,3-bis-(5-méthanesulfinylbutyl)-thiourée à partir du sulforaphane

Synthèse du (D,L)-sulforaphane :

On dissout 40 g de 4-chlorobutyronitrile (réf. Aldrich C 3,000-0) dans 800 ml d'alcool éthylique absolu préalablement distillé sur sodium.

On ajoute ensuite 27 g de méthane thioate (réf. Fluka 71742) et on laisse sous agitation à 25°C pendant 15 heures. La suspension est filtrée sur papier et

évaporée sous pression réduite. On reprend par 400 ml d'éther éthylique. On filtre à nouveau sur papier. On obtient une solution étherée contenant 32 g de 4-méthylthiobutyronitrile brut.

On prépare une suspension de 25 g d'hydrure de lithium-aluminium dans 400 ml d'éther éthylique.

On ajoute progressivement la solution de 4-méthylthiobutyronitrile à la suspension d'hydrure de lithium-aluminium, puis on porte à reflux pendant 2 h 30.

La suspension est ensuite neutralisée en ajoutant lentement et sous reflux 80 ml d'eau distillée. Quand l'ébullition cesse, on ajoute ensuite 120 ml d'eau distillée pour achever la neutralisation de l'hydrure restant. On filtre sur verre fritté. L'insoluble est lavé sur le filtre par 200 ml d'éther éthylique. Les fractions étherées sont réunies et évaporées à sec. On obtient 26,9 g de méthylthiobutylamine. On reprend le produit obtenu par 80 ml d'acétone à laquelle on ajoute petit à petit 23 ml de peroxyde d'hydrogène à 35 %. On place une nuit au bain-marie à 50°C.

On ajoute ensuite un peu de charbon actif, on filtre et on ajoute lentement 200 ml de chloroforme contenant 20 ml de thiophosgène, puis 300 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 5 %. On laisse agir 30 min.

On extrait ensuite le mélange à contre-courant par 8 fois 200 ml de dichlorométhane. La phase organique est recueillie, séchées sur sulfate de sodium et évaporée.

Le résidu est ensuite rectifié à 135 °C sous 7.10^{-2} Torr. On obtient 12,5 g de D,L-sulforaphane dont l'identité est vérifiée par spectrométrie de masse.

25

Synthèse de la 1,3-bis-(5-méthanesulfinylbutyl)-thiourée :

Les spectres infrarouges ont été obtenus sur un appareil Perkin-Elmer 1600 F11R (neat).

Les spectres de RMN du proton et du carbone 13 ont été obtenus sur un appareil Brucker AM 200 SY à 200 MHz pour le proton, 50,3 MHz pour le carbone. Les déplacements chimiques sont indiqués en partie par million (ppm) par rapport au

signal du chloroforme deutérié CDCl_3 à 7,25 ppm pour le proton et 76,9 ppm (raie centrale du deutériochloroforme) pour le carbone.

Les spectres de masse ont été obtenus sur un appareil Normag/SIDAR V 2.3 par les techniques d'ionisation chimique (NH_3) ou d'impact électronique.

5

Chromatographie

Les réactions ont été suivies en chromatographie sur couche mince sur des plaques de type silice gel 60F 254 (Merck, Art. 7735). Réactifs et produits ont été visualisés en lumière UV puis par traitement avec une solution éthanolique à 10%

10 d'acide phosphomolybdique suivi d'un chauffage.

Les Flash chromatographies ont été effectuées sur gel de silice ICN 60, 230-400 mesh.

Distillation des solvants

15 L'éther éthylique et le THF ont été distillés sous azote sur sodium/benzophénone. Le cyclohexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol utilisés pour les chromatographies ont été distillés avant emploi.

Méthode

20 Sous atmosphère inerte, 2g (11 mmol) de sulforaphane obtenu ci-dessus sont dilués dans 15 ml d'eau, puis la solution est portée à reflux pendant 24 heures, à l'abri de la lumière.

A température ambiante, la solution est concentrée sous pression réduite et le résidu est repris par du dichlorométhane pour être chromatographié sur une

25 colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / CH_3OH : 90 / 10) pour conduire à 1,70 g (5 mmol) de 1,3-bis-(5-méthanesulfinylbutyl)-thiourée (bis MSiBT) sous la forme d'une huile incolore, avec un rendement de 43%.30 **RMN ^1H (300 MHz) :** 6,45 (dl, 2H, NH), 3,53 (t. H, $J = 6,0$ Hz), 2,87 (m, 4H), 2,65 (s, 6H), 1,78 (m, 8H).

RMN ^{13}C (50,3 MHz) : 24,0 (CH_2), 32,1 (CH_2), 41,2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 47,2 (CH_3), 57,4 (CH_2SO), C (IV) non observé.

IR (ν , cm^{-1}) : 2176, 2096, 1140, 940 cm^{-1} .

IC.MS m/z : 312 (MH^+).

Exemple 2 : Préparation de la 1-(5-méthanesulfinylbutyl)-3-(5-méthanesulfonylbutyl)-thiourée

L'oxydation d'un seul des deux atomes de soufre de la molécule de sulforaphane est obtenue en ne réalisant pas la réaction de l'exemple 1 de synthèse de la 1,3-bis-(5-méthanesulfinylbutyl)-thiourée sous atmosphère inerte mais à l'air libre.

1g (5,5 mmol) de sulforaphane sont dilués dans 10 ml d'eau, puis la solution est portée aux reflux pendant 24 heures, à l'abri de la lumière.

A température ambiante, la solution est concentrée sous pression réduite et le résidu est repris par du dichlorométhane pour être chromatographié sur une colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / CH_3OH : 90/10) pour conduire à 200mg de 1-(5-méthanesulfinylbutyl)-3-(5-méthanesulfonylbutyl)-thiourée (MSBMSBT) sous la forme d'une huile incolore, avec un rendement de 12%.

RMN ^1H (300 MHz) : 6,55 (sl, 2H, NH), 3,55 (t, 4H, CH_2), 3,15 (t, 2H, SO_2CH_2), 2,80 (t, 2H, SOCH_2), 2,60 (s, 3H, SOCH_3), 2,90 (s, 3H, SO_2CH_3), 1,80-1,87 (m, 8H, CH_2).

RMN ^{13}C (50,3 MHz) : 20,5 (CH_2), 28,5 (CH_2), 39,8 (CH_3SO), 41,0 (CH_3SO_2), 43,5 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 54,1 (CH_2SO), 44,8 (CH_2SO_2), 183,35 (C=S).

IR (ν , cm^{-1}) : 2176, 2096, 1140, 940 cm^{-1} .

IC.MS m/z : 328 (MH^+).

Exemple 3 : préparation de la 1,3-bis-(5-méthanesulfonylbutyl) thiourée à partir de 1-isothiocyanato-4- méthylsulfonylbutane

1 g, (5 mmol) d'une solution de 1-isothiocyanato-4-méthylsulfonylbutane dans 15 ml d'eau est porté à reflux pendant 3 heures. A température ambiante, la solution est concentrée sous pression réduite et le résidu purifié par recristallisation au

méthanol pour conduire à 535 mg de la 1,3-bis-(5-méthanesulfonylbutyl) thiourée (bis MSoBT) sous la forme d'un solide beige, soit un rendement de 40%.

5 RMN ¹H (300 MHz) : 6,50 (sl, H, NH), 3,55 (t, 4H, *J* = 6.0 Hz), 2,75 (t, 4H, SO₂CH₂), 2,60 (s, 6H, SO₂CH₃), 1,70-1,90 (m, 8H, CH₂CH₂).

RMN ¹³C (50,3 MHz) : 21,0 (CH₂), 29,2 (CH₂), 38,5 (CH₃), 44,0 (CH₂-NH), 53,9 (CH₂SO), 182,6 (C=S).

IR (ν, cm⁻¹) : 2168, 2096, 1144, 930 cm⁻¹.

IC.MS *m/z* : 344 (MH⁺).

10 Point de fusion: 142 °C.

Exemple 4: préparation de la bis (MSoBT) à partir de la bis MSiBT

15 A une solution de bis MSiBT (1 g, 3 mmol) dans 10 ml d'acétone sont ajoutés lentement à 0°C 0,70 ml (2,2 équiv., 6,6 mmol) de peroxyde d'hydrogène à 35%. Le milieu réactionnel est alors laissé évoluer à température ambiante pendant 40 heures. L'acétone est éliminée par évaporation sous vide. Le résidu aqueux est repris dans du chloroforme et la phase est directement piégée par du sulfate de sodium. La phase organique est concentrée sous vide et le résidu purifié par
20 recristallisation au méthanol pour conduire à la bis MSoBT sous forme d'un solide beige avec un rendement de 30%.

Exemple 5: étude de l'effet anti-tyrosinase de la bis MSoBT en comparaison avec l'acide kojique

25

Mesure du pouvoir inhibiteur de la tyrosinase :

On utilise la réaction suivante : la L Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, obtenue chez la société Sigma (ref D-9626)) incolore est oxydée en dopachrome
30 colorée absorbant à 475 nm. Cette réaction est catalysée par la tyrosinase fongique (EC 1.14.18.1, obtenue chez la société Sigma (réf T-7755)). La cinétique de la

réaction est enregistrée par la mesure de la densité optique (D.O.) en fonction du temps à 30° C.

Les compositions des différentes solutions utilisées sont les suivantes :

5 Tampon pH 6,8 :

Tampon phosphate 0,1M, pH 6,8

Solution de substrat :

5mM de L-DOPA dans la solution tampon pH 6,8

10 Solutions d'inhibiteurs :

Les molécules inhibitrices sont dissoutes directement dans le tampon pH 6,8, dans le méthanol à 50 % (méthanol - eau distillée) ou dans le méthanol pur selon leur solubilité.

Les concentrations en poids par volume des différentes solutions d'inhibiteurs

15 sont : 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,0125 %, 0,00625 % et 0,00312 %.

Solution d'enzyme :

250 unités de tyrosinase dans la solution tampon pH 6,8.

20 L'action de la tyrosinase est évaluée par la vitesse initiale de la réaction mesurée sur les enregistrements de D.O.

On porte sur une courbe les vitesses initiales des réactions sans inhibiteurs (concentration 0) et les vitesses aux diverses concentrations testées.

Le pouvoir inhibiteur d'une molécule est défini comme la concentration qui réduit
25 de 50 % l'action de la tyrosinase.

La lecture se fait pendant 3mn et le pourcentage d'inhibition est calculé (vitesse d'inhibition et plateau de saturation). La bis MSoBT fabriquée de la façon indiquée ci-dessus, inhibe l'activité enzymatique de la tyrosinase de 50 % à la concentration de 8,3 mM final. L'acide kojique (obtenu chez la société Aldrich

30 ref. : 22,046-9) montre le même pourcentage d'inhibition à la concentration de 0,670 mM final.

La faible solubilité dans l'eau de la bis MSiBT et de la MSBMSBT n'a pas permis de tester ces molécules pour leur effet anti-tyrosinase.

Exemple 6 : étude de l'effet dépigmentant de la bis MSiBT, de la MSBMSBT et de la bis MSoBT en comparaison avec l'acide kojique et la diméthylthiourée

Les molécules bis MSiBT, MSBMSBT et bis MSoBT ont également été testés sur des co-cultures mélanocytes - kératinocytes humains produisant de la mélanine afin de tester leur effet dépigmentant sur un système vivant représentant l'unité de mélanisation telle qu'elle existe dans la peau humaine fonctionnelle.

L'acide kojique et la diméthylthiourée ont été utilisés comme témoins positifs dans ce test.

Les épidermes pigmentés (phénotype noir / co-culture de kératinocytes et mélanocytes normaux à l'interface air - liquide) proviennent et sont cultivés selon les recommandations de MatTek Corporation, USA. Les milieux de cultures sont fournis également par ce fabricant. Les produits (acide kojique 35 mM, diméthylthiourée 2,8 mM obtenue chez la société Aldrich ref. : D 18,870-0, bis MSiBT 2,8 mM obtenu par le procédé indiqué ci-dessus, MSBMSBT 2,8 mM obtenu par le procédé indiqué ci-dessus et bis MSoBT obtenu par le procédé indiqué ci-dessus 2,8 mM) sont appliqués dans le milieu de culture pendant 21 jours.

Chaque produit est appliqué à quatre puits de culture en solution dans du milieu de culture. L'effet dépigmentant des produits est nettement visible puisque les épidermes témoins se pigmentent progressivement alors que les épidermes traités par les produits les plus actifs montrent une pigmentation nettement moins foncée. L'évaluation de l'effet dépigmentant est réalisée par extraction de la mélanine des puits de culture.

L'extraction est réalisée sur un pool de deux puits de culture qui sont homogénéisés dans 0,45 ml de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 1% contenant 0,05 mM d'EDTA et 10 mM de Tris HCl (amino-2-(hydroxyméthyl)-2-propanediol-1,3), pH 6,8. A chaque homogénat. 20 µl de protéinase K à 5 mg/ml est ajoutée.

La digestion est réalisée pendant une nuit à 45°C. On ajoute ensuite à nouveau 20 µl de protéinase K et l'incubation est poursuivie pendant 4 heures. On ajoute ensuite 50 µl de solution 0,5 M de carbonate de sodium et 10 µl d'une solution à 30% de peroxyde d'hydrogène. Les échantillons sont maintenus à 80°C pendant 5 30 min et refroidis. Les échantillons sont extraits par 100 µl d'un mélange chloroforme- méthanol (2 : 1, v/v). Après centrifugation à 10,000 g pendant 10 min, la densité optique du surnageant est mesurée à 405 nm. Les produits sont comparés entre eux dans le tableau 1 suivant (les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la mélanine dans les co-cultures) :

10

Produit testé	Concentration en mM	Inhibition %
Acide kojique	35	32
Diméthylthiourée	2,8	36
Bis MSiBT	2,8	7,5
MSBMSBT	2,8	18
Bis MSoBT	2,8	29,6

D'une façon surprenante, la bis MSiBT manifeste une activité dépigmentante plus faible que la MSBMSBT et surtout que la bis MSoBT dont la concentration nécessaire à l'obtention de 30% d'inhibition environ est 25 fois plus faible que 15 pour l'acide kojique qui est la molécule de référence largement utilisée dans le commerce des produits destinés à éclaircir la peau.

Les produits selon la présente invention possèdent donc une activité dépigmentante.

20 **Exemple 7 : évaluation de l'effet antimutagène de la bis MsoBT**

Cette propriété a été mise en évidence dans une version modifiée du test de Ames, le test Vitotox 10kit (6400000) de la société Thermolab Systems.

25 D'une façon générale le test Vitotox est basé sur des bactéries contenant l'opéron *lux* de *Vibrio fischeri* sous le contrôle transcriptionnel du promoteur *recN* muté

(contrôlé par le système SOS de la bactérie). Après incubation des bactéries avec un produit génotoxique, le promoteur *recN* est déréprimé et l'opéron *lux* s'exprime : émission de lumière, émission qui est proportionnelle à la génotoxicité du produit. Certains produits agissent directement sur la production de lumière ou
5 augmentent le métabolisme des bactéries, créant de faux positifs. Aussi, une souche bactérienne, possédant un opéron *lux* constitutif est utilisée en contrôle. Cette même souche est utilisée comme contrôle de cytotoxicité (faux négatifs).

10 **Exemple 7.1. : évaluation de l'effet antimutagène de la bis MsoBT vis-à-vis du MMS (méthylméthanesulfonate)**

Afin de tester l'effet antimutagène vis-à-vis de molécules génotoxiques, on utilise une molécule génotoxique, le méthylméthanesulfonate (MMS) que l'on compare à la génotoxicité d'un mélange de molécules mutagènes de référence, 4-
15 nitroquinoline oxide et benzo(a)pyrene. Le MMS est placé seul ou en mélange avec la bis MsoBT à des concentrations croissantes et on compare les émissions de lumière. On peut alors définir une concentration inhibitrice 50 de la mutagénèse.

20 Des cultures de *Salmonella typhimurium* TA 104 recN2-4 (pour le test de la génotoxicité) et de *Salmonella typhimurium* TA 104 pr1 (pour le test de la cytotoxicité) dans du milieu Nutrient Broth 8g/L sont réalisées puis incubées à 37°C sous agitation pendant une nuit (DO comprise entre 0,2 et 0,5 pour les bactéries pour le test de génotoxicité et entre 0,4 et 0,6 pour les bactéries pour le
25 test de cytotoxicité). Le lendemain, les bactéries pour le test de génotoxicité sont diluées au 1/10 avec du milieu Nutrient Broth et au 1/2 pour les bactéries pour le test de cytotoxicité.

Une solution mère de MMS à 90 mM dans de l'H₂O est préparée et des dilutions sériees au 1/2 dans plaque 96 sont réalisées. Les produits génotoxiques de référence
30 (4-nitroquinolineoxide (NQO)/benzo(a)pyrene(BAP)) sont utilisés à 0,4 ppm pour

le NQO et 800 ppm pour le BAP). Le produit à tester est utilisé avec ou sans activation métabolique (fraction S9 : homogénat microsomal contenant du cytochrome P450 : 2,45 mL/mL finale).

La cinétique d'émission de lumière, en fonction de la génotoxicité et de la cytotoxicité du produit, est mesurée pendant 3 heures (mesures toutes les 5 minutes) avec un Fluoroskan Ascent FL (ThermoLabsystems).

Les produits sont fournis par les sociétés Sigma – Aldrich.

Résultats :

10

La bis MsoBT présente une concentration inhibitrice 50 de l'effet mutagène du MMS de 17 p.p.m sans S9 et de 20 p.p.m avec S9.

Exemple 7.2 : évaluation de l'effet antimutagène de la bis MsoBT vis-à-vis des UV B

15

Afin d'évaluer l'effet antimutagène vis-à-vis des UVB, les cultures bactériennes sont irradiées pendant une durée permettant une émission moyenne de 20 unités lumineuses (RLU). On place ensuite la bis MsoBT à concentrations croissantes dans le milieu de culture avant irradiation et on détermine une concentration inhibitrice 50.

20

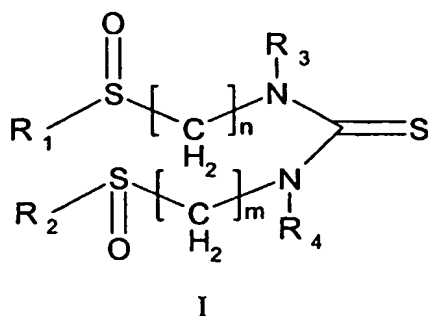
On opère comme dans l'exemple 1 mais sans MMS et en irradiant les cultures bactériennes pendant 20 s par des UVB 254 nm.

25

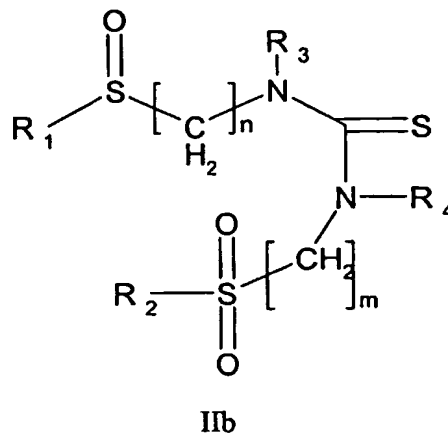
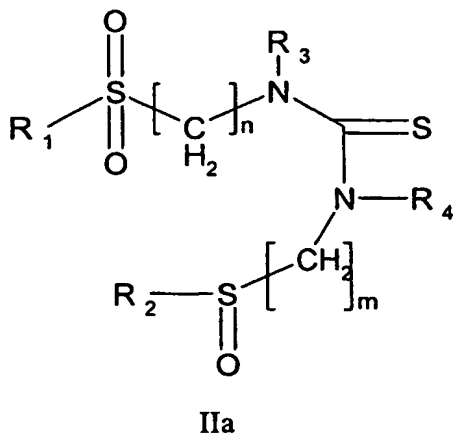
Dans ces conditions, la MsoBT présente une concentration inhibitrice 50 de l'effet mutagène induit par les UV B de 25 p.p.m.

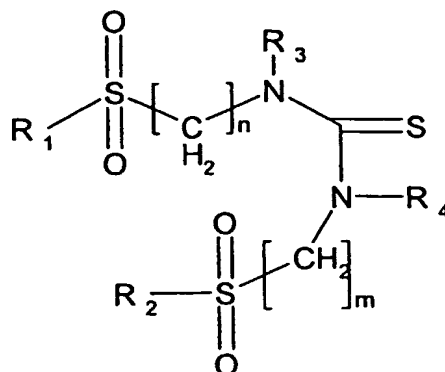
REVENDICATIONS

1. Médicament comprenant au moins une thiourée de formule générale I
5 suivante :



- 10 dans laquelle :
 n est un nombre entier compris entre 1 et 12,
 m est un nombre entier compris entre 1 et 12,
 R₁, R₂, R₃ et R₄ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome
 d'hydrogène, un groupe alkyle en C₁-C₆ ou un groupe aryle,
 15 ou au moins un de ses dérivés mono ou dioxydés de formules générales IIa, IIb et
 III suivantes :





dans lesquels les R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , m et n sont tels que définis ci-dessus.

5 ou leurs mélanges.

2. Médicament selon la revendication 1 pour inhiber la tyrosinase, inhiber la synthèse de la mélanine, ou réduire l'hyperactivité des mélanocytes.

10 3. Médicament selon la revendication 1 en tant qu'agent antimutagène et/ou anticarcinogène.

4. Médicament selon la revendication 3 pour prévenir l'apparition du cancer, en particulier du cancer de la peau.

15

5. Médicament selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les groupes R_1 et R_2 sont identiques, R_3 et R_4 sont identiques et $m = n$.

20 6. Médicament selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$.

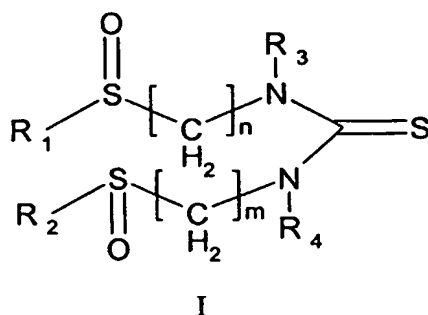
7. Médicament selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que $m = n = 4$.

25

8. Médicament selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que $R_3 = R_4 = H$.

9. Médicament selon l'une quelconque des revendications précédentes
5 caractérisé en ce qu'il se trouve sous une forme à usage topique.

10. Composition cosmétique dépigmentante comprenant au moins une thiourée de formule générale I suivante :



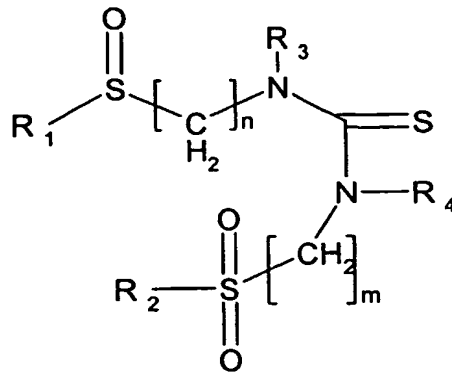
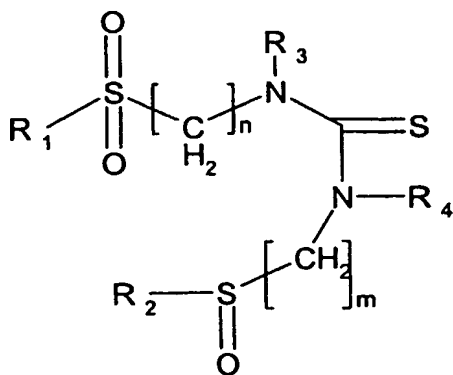
dans laquelle :

n est un nombre entier compris entre 1 et 12,

15 m est un nombre entier compris entre 1 et 12,

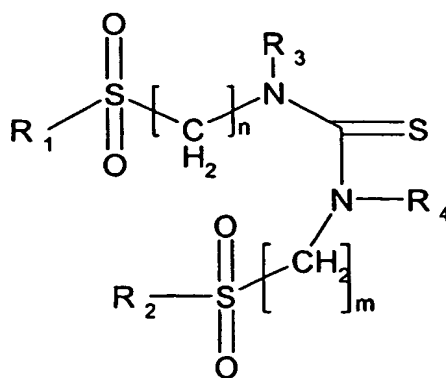
R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C_1 - C_6 ou un groupe aryle,

ou au moins un de ses dérivés mono ou dioxydés de formules générales IIa, IIb et III suivantes :



IIa

IIb



III

- 5 dans lesquels les R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , m et n sont tels que définis ci-dessus.
ou leurs mélanges.

11. Utilisation d'une composition cosmétique selon la revendication 10
pour éclaircir, blanchir ou dépigmenter l'épiderme, éliminer les taches de la peau,
10 en particulier de vieillesse ou de rousseur, ou prévenir la pigmentation de
l'épiderme.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/17 A61P17/00 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIN, YI ET AL: "Thermal Degradation of Sulforaphane in Aqueous Solution" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY (1999), 47(8), 3121-3123, XP001159126	10
A	cited in the application abstract; figure 2 --- -/--	1-9, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2004

Date of mailing of the international search report

22/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoff, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/07

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BACHELARD, H. S. ET AL: "Studies on endemic goiter. III. An investigation of the antithyroid activities of isothiocyanates and derivatives with observations on fractions of milk from goitrous areas" AUSTRALIAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES (1963), 16, 177-91, XP008018337	10
A	abstract page 184	1-9, 11
A	--- WO 02 058664 A (JEAN DANIEL ; LMD (FR)) 1 August 2002 (2002-08-01) cited in the application abstract; claims; examples	1-11
A	--- WO 01 64206 A (CURTO ERNEST V ; DOOLEY THOMAS P (US); INTEGRIDERM INC (US)) 7 September 2001 (2001-09-07) abstract claims; example 3	1-11
A	--- WO 94 19948 A (CHO CHEON GYU ; POSNER GARY H (US); TALALAY PAUL (US); ZHANG YUESHE) 15 September 1994 (1994-09-15) abstract; claims; examples -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information about patent family members

International Application No

PCT/FR 03/007

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02058664	A	01-08-2002	FR 2820036 A1	02-08-2002
			CA 2435942 A1	01-08-2002
			CZ 20032012 A3	14-01-2004
			EP 1353644 A1	22-10-2003
			WO 02058664 A1	01-08-2002
			HU 0303018 A2	29-12-2003
WO 0164206	A	07-09-2001	AU 4333401 A	12-09-2001
			CA 2401336 A1	07-09-2001
			EP 1267868 A2	02-01-2003
			WO 0164206 A2	07-09-2001
			US 2003219393 A1	27-11-2003
			US 2002044914 A1	18-04-2002
WO 9419948	A	15-09-1994	US 5411986 A	02-05-1995
			WO 9419948 A1	15-09-1994
			US RE36784 E	18-07-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/007

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K31/17 A61P17/00 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JIN, YI ET AL: "Thermal Degradation of Sulforaphane in Aqueous Solution" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY (1999), 47(8), 3121-3123, XP001159126 cité dans la demande abrégé; figure 2	10
A	---	1-9, 11
	--- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 mars 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/03/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoff, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/07

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BACHELARD, H. S. ET AL: "Studies on endemic goiter. III. An investigation of the antithyroid activities of isothiocyanates and derivatives with observations on fractions of milk from goitrous areas" AUSTRALIAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES (1963), 16, 177-91, XP008018337	10
A	abrégé page 184	1-9, 11
A	--- WO 02 058664 A (JEAN DANIEL ; LMD (FR)) 1 août 2002 (2002-08-01) cité dans la demande abrégé; revendications; exemples	1-11
A	--- WO 01 64206 A (CURTO ERNEST V ; DOOLEY THOMAS P (US); INTEGRIDERM INC (US)) 7 septembre 2001 (2001-09-07) abrégé revendications; exemple 3	1-11
A	--- WO 94 19948 A (CHO CHEON GYU ; POSNER GARY H (US); TALALAY PAUL (US); ZHANG YUESHE) 15 septembre 1994 (1994-09-15) abrégé; revendications; exemples	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/007

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02058664 A	01-08-2002	FR 2820036 A1	02-08-2002
		CA 2435942 A1	01-08-2002
		CZ 20032012 A3	14-01-2004
		EP 1353644 A1	22-10-2003
		WO 02058664 A1	01-08-2002
		HU 0303018 A2	29-12-2003
WO 0164206 A	07-09-2001	AU 4333401 A	12-09-2001
		CA 2401336 A1	07-09-2001
		EP 1267868 A2	02-01-2003
		WO 0164206 A2	07-09-2001
		US 2003219393 A1	27-11-2003
		US 2002044914 A1	18-04-2002
WO 9419948 A	15-09-1994	US 5411986 A	02-05-1995
		WO 9419948 A1	15-09-1994
		US RE36784 E	18-07-2000